



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 196 04 588 A 1

⑤1 Int. Cl. 6:
C 12 N 15/82
A 01 H 1/06
C 07 K 16/00

②1 Aktenzeichen: 196 04 588.6
②2 Anmeldetag: 8. 2. 96
④3 Offenlegungstag: 14. 8. 97

DE 196 04 588 A 1

⑦1 Anmelder:
Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben, DE

⑦2 Erfinder:
Conrad, Udo, Dr., 06458 Hausneindorf, DE; Fiedler,
Ulrike, 06466 Gatersleben, DE; Phillips, Julian, Dr.,
06466 Gatersleben, DE; Artsaenko, Olga, 06466
Gatersleben, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Expressionskassette für die samenspezifische Expression

⑤7 Die Erfindung betrifft eine Expressionskassette für die samenspezifische Expression, insbesondere von Einketten-Antikörperfragmenten in transgenen Tabakpflanzen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Biomedizin, die Lebensmittelkontrolle und die Landwirtschaft.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt

- einen samenspezifischen Promoter,
- das LEB4-Signalpeptid,
- ein zu exprimierendes Gen und
- ein ER-Retentionssignal.

Bevorzugt ist eine Expressionskassette, die als samenspezifischen Promoter den USP-Promoter oder den LEB4-Promoter und als Gen das Gen für ein Einketten-Antikörperfragment enthält.

DE 196 04 588 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Expressionskassette für die samenspezifische Expression, insbesondere von Einketten-Antikörperfragmenten in transgenen Tabakpflanzen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Biomedizin, die Lebensmittelkontrolle und die Landwirtschaft.

Etablierte und zuverlässige Methoden der Genklonierung und der Gentechnik und jüngste Entwicklungen der Technologie transgener Pflanzen ermöglichen weitere Fortschritte in der Pflanzenbiotechnologie. Pflanzenteile können mehr und mehr als Produktionsstätten für Stoffe, die sonst schwer zugänglich sind, dienen. So ist es gelungen, Immunglobulingene in transgenen Tabakpflanzen zur Expression zu bringen. Die dabei erzielten Expressionsraten liegen zwischen 0,1 und 1,3% des gesamten löslichen Proteins des Blattes. Für alle diese Experimente wurden ubiquitäre Expression gewährleistende Promotoren benutzt, die Expression erfolgte entweder cytoplasmatisch oder in Apoplasten pflanzlicher Zellen (Conrad und Fiedler, *Plant Molecular Biol.* 26, 1023—1030 (1994)).

Durch Anhängen eines Signals zur Retention im endoplasmatischen Retikulum (ER) an ein Einketten-Antikörpergen (ScFv-Gen) kann der Antikörper in diesem speziellen Kompartiment von Blattzellen transgener Pflanzen fixiert werden. Diese Fixierung führt zu einer Steigerung der Expressionsrate von Einketten-Antikörperfragmenten in Blättern transgener Pflanzen auf 4,8% des gesamten löslichen Proteins (Artsaenko et al, *Plant J.* 8, 745—750 (1995)).

Weitere Arbeiten betreffen die spezifische Expression von Genprodukten in pflanzlichen Speicherorganen, vor allem in Samen. Mit Hilfe eines samenspezifischen Promoters konnten Einketten-Antikörperfragmente stabil bis zu 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, *Bio/Technology* 10, 1090—1094 (1995)).

Trotz dieser Fortschritte waren die erreichten Expressionsraten in Pflanzensamen bisher zu gering, um eine pflanzenbiotechnologische Produktion der gewünschten Stoffe darauf zu begründen.

Die Erfindung hat das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann. Eine spezielle Aufgabe besteht darin, Einketten-Antikörperfragmente in Tabaksamen zu exprimieren.

Die Zielstellung der Erfindung wird mit der in den Ansprüchen 1 bis 6 beschriebenen Expressionskassette erreicht.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthält einen samenspezifischen Promoter (bevorzugt den USP- oder den LEB4-Promoter, das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal.

Der Aufbau der Kassette ist in der Abbildung I am Beispiel eines Einketten-Antikörpergens (ScFv-Gen) schematisch dargestellt.

Von besonderer Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg ist das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL, die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Im Falle des Einsatzes des LeB4-Promoters beträgt die samenspezifische Expression ca. 1,9% des gesamten löslichen Proteins, wobei die Einketten-Antikörperexpression ab Tag 16 der Samenentwicklung beginnt. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz des USP-Promoters zum Aufbau der Expressionskassette. Er wird während der Samenentwicklung früher aktiv, wodurch der zur Anreicherung des exprimierten Produkts zur Verfügung stehende Zeitraum verlängert wird. Die Expressionsrate liegt daher höher als bei Kassetten mit dem LeB4-Promoter.

Zum Umfang der Erfindung gehört auch die Verwendung der Expressionskassette, die durch Elektroporation in Bakterienstämme und anschließenden Transfer der entstandenen rekombinanten Klone in dicotyle Pflanzen erfolgt. Die das gewünschte Genprodukt im Samen exprimierende Pflanzen werden selektiert und als genetisch stabile Linien gezüchtet. Nach der Ernte werden dann die gewünschten Genprodukte aus den transgenen Samen in an sich bekannter Weise extrahiert.

Die Wirkung der erfindungsgemäßen Kassette war überraschend, weil aus eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen bekannt ist, daß stabil exprimierte Antikörper im Samen auch ohne ER-Retentionssignal im ER oder in ER-abgeleiteten Vesikeln liegen. Deshalb war nicht zu erwarten, daß die erfindungsgemäße Fusion mit einem Retentionssignal eine deutliche Steigerung der Expressionshöhe bewirkt.

Durch die Erfindung wird ermöglicht, sonst schwer zugängliche Stoffe, z. B. Immunglobuline, mit hoher Expressionsrate in Pflanzensamen zu exprimieren und dadurch für eine biotechnologische Nutzung zur Verfügung zu stellen. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß Einketten-Antikörperfragmente bei der Lagerung in Tabaksamen längere Zeit (mindestens ein Jahr) stabil bleiben.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1 Expression und Anreicherung des Einketten-Antikörper

fragmentes scFv-ox im endoplasmatischen Retikulum von transgenen Tabaksamen

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein monoklonaler Antikörper (NQ10-125, Berek and Milstein, 1988), dessen Epitope gegen ein nicht in Pflanzen vorkommendes Antigen (Phenyloxazon) gerichtet sind, um eventuelle Einflüsse auf den pflanzlichen Metabolismus auszuschließen und der außerdem eine hohe Bindungsaffinität aufweist. Die Hybridomazelllinie NQ 10/125 ist dadurch charakterisiert, daß die sekretierten, gegen das

Antigen Phenyloxazon gerichteten monoklonalen Antikörper eine hohen Affinität aufweisen (Dissoziationskonstante 1×10^{-8} M) und die spezifischen Sequenzen der Immunglobulingene verfügbar sind (Berek et al, 1985). Dieser monoklonale Antikörper war Ausgangspunkt für die Konstruktion des Einketten-Antikörperfragmentes -scFv-ox.

Zunächst wurde mRNA aus den Hybridomzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für die Amplifikation der variablen Immunglobulingene VH und VK mit den spezifischen Primern VH1 BACK und VH FOR-2 für die schwere Kette sowie VK2 BACK und MJK5 FQN X für die leichte Kette (Clackson et al, 1991). Die isolierten variablen Immunglobulingene waren Ausgangspunkt für die Konstruktion eines Einketten-Antikörperfragmentes (scFv). Bei der nachfolgenden Fusions-PCR wurden drei Komponenten VH, VK und ein Linkerfragment in einem PCR-Reaktionsansatz vereinigt und das scFv-ox amplifiziert (Abb. 1). Das konstruierte scFv-ox-Gen hatte eine Größe von 735 bp. Die variablen Domänen wurden in der Reihenfolge VH-L-VL miteinander fusioniert.

Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) des konstruierten scFv-ox-Gens erfolgte nach Expression in einem bakteriellen System. Das scFv-ox wurde dazu als lösliches Antikörperfragment synthetisiert (Hoogenboom et al, 1991). Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurde in ELISA-Tests überprüft (Abb. 2).

Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-Gen stromabwärts vom LeB4-Promoter kloniert. Der aus *Vicia faba* isolierte LeB4-Promoter zeigt eine streng samenspezifische Expression von verschiedenen Fremdgenen in Tabak (Bäumlein et al, 1987, 1991). Durch Transport des scFv-Proteins in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-Gen wurde dafür mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al, 1992), fusioniert (Abb. 3).

Die konstruierte Expressionskassette (Konstrukt 11) wurde in den binären Vektor pGSGluc1 (Saito et al, 1990) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobakterienklone wurden für die nachfolgende Transformation von *Nicotiana tabacum* verwendet. Pro Konstrukt wurden 70–140 Tabakpflanzen regeneriert. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung sowohl reife als auch Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen der Serie 11 zeigt, daß durch die Fusion des scFv-Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL eine maximale Akkumulation von 1,9% scFv-Proteine im reifen Samen erzielt werden konnte (Tab. 1).

Tabelle 1

Zusammenfassende Darstellung des verwendeten samenspezifischen Konstruktes, der Anzahl getesteter und transgener Pflanzen, deren durchschnittliche scFv-Proteinexpression im reifen Samen sowie die Antigenbindungsaktivität der Antikörperfragmente. Die Expressionsniveaus wurden durch Western-Blot-Analysen, die spezifische Bindungsaktivität mittels direktem ELISA bestimmt.

Konstrukt	Anzahl der regenerierten Pflanzen	Anzahl der transgenen Pflanzen	Anzahl der scFv-Protein exprimierenden Pflanzen	Durchschnittliches/höchstes Expressionsniveau (% vom TSP)	Durchschnittliche spezifische Aktivität (OD/ μ g scFv)
11 LeB4-SP-scFv-Tag-KDEL	103	65	63	0,98/1,90	1,36

Neben Untersuchungen zur Akkumulation sollte der Frage nachgegangen werden, ob die im reifen Samen abgelagerten Antikörperfragmente noch ihre biologische Aktivität besitzen, d. h. das entsprechende Antigen Oxazon noch spezifisch binden. Die spezifische Aktivität wurde in den Extrakten der reifen Tabaksamen mit einem direkten ELISA bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte, die in Tab. 1 aufgeführt sind, zeigen deutlich, daß die aus trockenem Tabaksamen hergestellten Proteinextrakte funktionell aktive Antikörperfragmente enthalten. In weiteren Experimenten wurde die Stabilität der im reifen Samen akkumulierten Antikörperfragmente nach Lagerung untersucht. Dazu wurden die Tabaksamen ca. 1 Jahr bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Untersuchungen ergaben, daß die Menge und die Aktivität der akkumulierten Antikörperfragmente auch nach einjähriger Lagerung erhalten bleibt.

Das pflanzliche Wachstum und die Samenentwicklung bzw. -produktion wurden durch die Synthese der rekombinanten Proteine nicht beeinflusst.

Beispiel 2 Samenspezifische Expression und Anreicherung von Einketten-Antikörperfragmenten im endoplasmatischen Retikulum von Zellen transgener Tahaksaien kontrolliert durch den USP-Promotor

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein ein Einzelketten-Antikörperfragment gegen das Phytohormon Abscisinsäure (Artsaenko et al, 1994).

Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) dieses konstruierten scFv-aABA-Genes erfolgte nach Expression in einem bakteriellen System und nach Expression in Tabakblättern (Artsaenko et al, 1994, 1995). Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurde in ELISA-Testen überprüft.

Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-Gen stromabwärts vom USP-Promoter kloniert. Der aus *Vicia faba* isolierte USP-Promoter zeigt eine streng samenspezifische Expression von verschiedenen Fremdgenen in Tabak (Fiedler et al, 1993). Durch Transport des scFv-Proteins in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-Gen wurde dafür mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al, 1992), fusioniert (Abb. 4).

Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSG-LUC1 (Saito et al, 1990) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobakterienklone wurden für die nachfolgende Transformation von *Nicotiana tabacum* verwendet. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung sowohl reife als auch Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wäßrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen zeigt, daß durch die Fusion des scFv-Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL unter Kontrolle des USP-Promotors bereits ab Tag 10 der Samenentwicklung Einketten-Antikörperfragmente synthetisiert wurden.

Im Verlaufe der Samenentwicklung kam es zu einer deutlich stärkeren Anreicherung des Einketten-Antikörperfragmentes im Vergleich zur LeB4-Promotor-kontrollierten Expression.

Patentansprüche

1. Expressionskassette für die samenspezifische Expression, bestehend aus
 - einem samenspezifischen Promoter
 - dem LeB4-Signalpeptid
 - dem zu exprimierenden Gen und
 - einem ER-Retentionssignal.
2. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als samenspezifischer Promoter der USP-Promoter eingesetzt wird.
3. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als samenspezifischer Promoter der LeB4-Promoter eingesetzt wird.
4. Expressionskassette nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen eines Einketten-Antikörperfragments eingesetzt wird.
5. Expressionskassette nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen eines rekombinanten Antikörperfragmentes als Translationsfusion mit anderen funktionellen Proteinen wie zum Beispiel Enzymen, Toxinen, Chromophoren und Bindungsproteinen eingesetzt wird.
6. Expressionskassette nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie
 - den USP-Promoter oder den LeB4-Promoter
 - das LeB4-Signalpeptid
 - das Gen für ein Einketten-Antikörperfragment und
 - ein ER-Retentionssignal enthält.
7. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kassette durch Elektroporation in Bakterienstämme transferiert wird und die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen Pflanzen verwendet, Pflanzen, die im Samen Genprodukte exprimieren, selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die Genprodukte aus den Samen der transgenen Pflanzen extrahiert werden.
8. Verwendung nach Anspruch 7 der Expressionskassette nach Anspruch 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kassette durch Elektroporation in Bakterienstämme transferiert wird und die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen Pflanzen verwendet, transgene Einketten-Antikörperfragmente im Samen exprimierende Pflanzen selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die Einketten-Antikörper aus den Samen der transgenen Pflanzen extrahiert werden.
9. Verwendung nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als dicotyle Pflanzen Tabakpflanzen ausgewählt werden.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

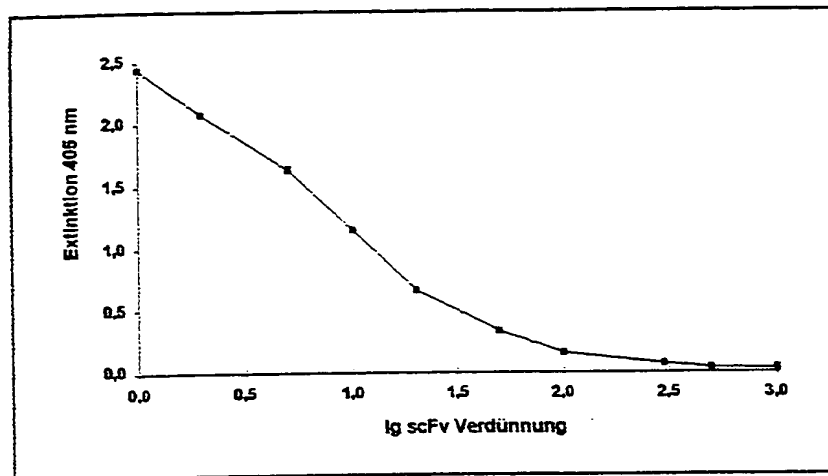


Abb. 2: Funktionelle Charakterisierung des scFv-ox 9 im direkten ELISA.

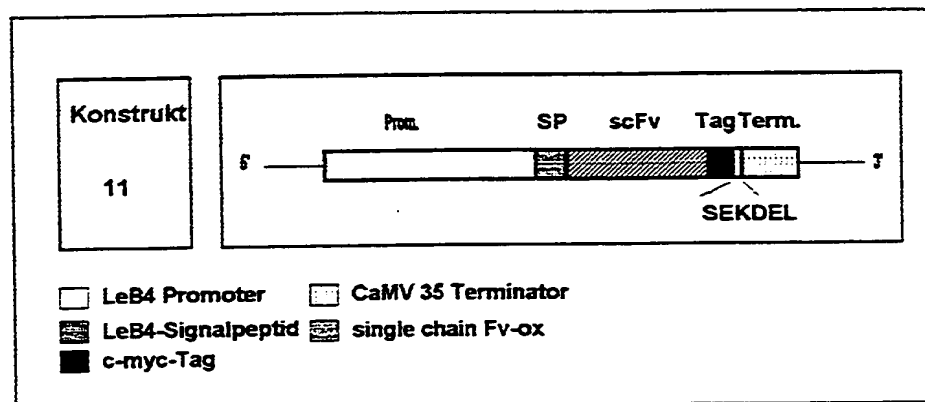


Abb. 3: Schematische Darstellung der Kassette zur samenspezifischen Expression des scFv-ox-Gens.

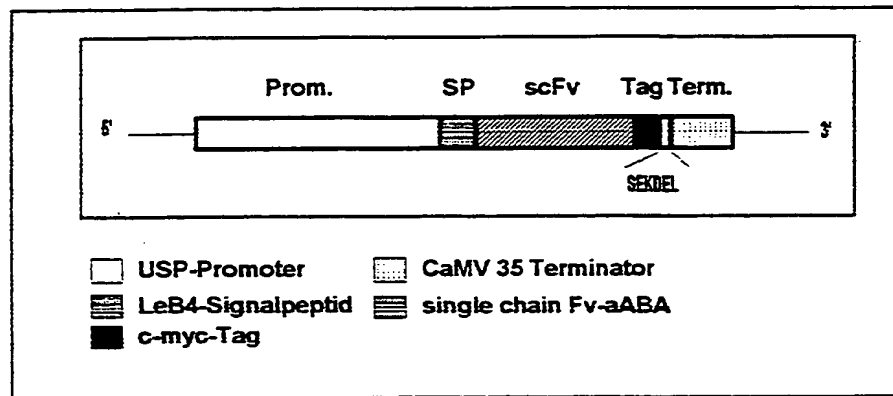


Abb. 4: Schematische Darstellung der Kassette zur samenspezifischen Expression des scFv-aABA.

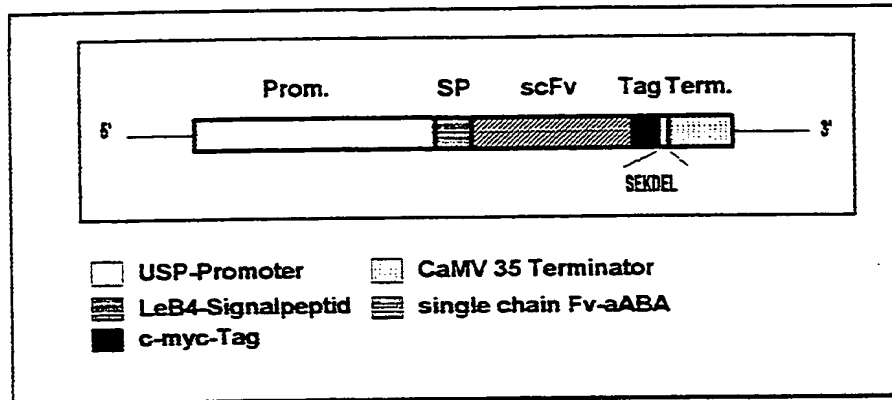


Abbildung I

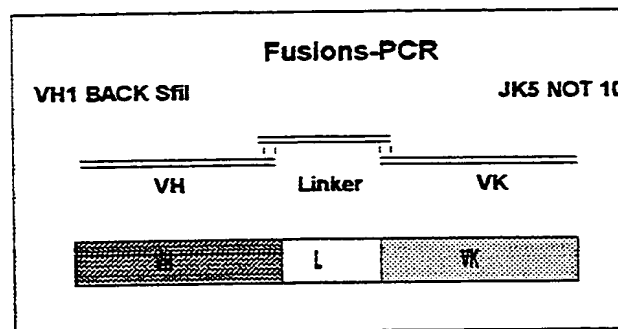


Abb. 1: Schematische Darstellung der Konstruktion des scFv-ox (V-Gen für V (variable) Region, L-Linker).